



**El empleo de adn mitocondrial como herramienta para la descripción de poblaciones
*Apis mellifera***

Using mitochondrial dna as a tool for describing populations of *Apis mellifera*

Autor: Lic. Carlos Ariel Yadró García.

1-Centro de Investigaciones Apícolas, Carretera de El Cano a El Chico km/0.Arroyo Arenas, La Lisa, La Habana, Cuba. Teléfono: 72020890.

reserva_c@ciapi.minag.cu

Recibido: 17-9-2015

Aprobado: 12-10-2015

RESUMEN

El empleo del ADN mitocondrial constituye una poderosa herramienta para estudios filogeográficos de poblaciones de *Apis mellifera* debido a su transmisión matrilineal. Se han analizado diversas regiones de esta molécula en cuanto a los polimorfismos de longitud de los fragmentos de restricción generados por diferentes enzimas. De estas técnicas la más estandarizada y ampliamente utilizada es el estudio de la región no codificante comprendida entre los genes COII y ARNt^{leu}, y de los fragmentos de restricción obtenidos al digerir esta región con la endonucleasa DraI. Con este tipo de ensayo ha sido posible identificar tres grupos que coinciden parcialmente con los linajes descritos por Ruttner en 1988. Además se han logrado describir numerosos haplotipos para cada uno de los grupos mencionados, que en parte reflejan el origen geográfico de las poblaciones. Este análisis también ha sido empleado para detectar procesos de africanización, fundamentalmente en América continental.

Palabras clave: abejas/ADN/RFLP/haplotipo/linajes/mitocondrial

ABSTRACT

The use of mitochondrial DNA is a powerful tool for phylogeographic studies of *Apis mellifera* populations because of its matrilineal transmission. Several regions of this molecule has been analyzed using the restriction fragments length polymorphisms (RFLP) generated by digestion with various enzymes. Of these, the more standardized and widely used variant is the study of the non-coding region between genes COII and tRNA^{Leu}, and the restriction fragments obtained by digesting this region with endonuclease DraI. With this type of test has been possible to identify three groups that overlap with the families described by Ruttner in 1988. It has also been possible to identify many haplotypes for each of the above groups, which in part reflect the geographical origin of populations. This analysis has also been employed to detect africanization processes, mainly in continental America.

Keywords: Honey bee/haplotypes/DNA/mitochondrial/lineage.

INTRODUCCIÓN

El hábitat natural de la abeja melífera, *Apis mellifera* se encuentra ampliamente extendido abarcando África, Europa y el Medio Oriente. Es comúnmente aceptado que *A. mellifera* se originó a partir de su pariente cercana *A. cereana* en la región centro-occidental de Asia y a partir de allí se expandió por Europa y luego por África (Ruttner, 1988; W. S. Sheppard y Meixner, 2003). Aún así existen discrepancias en cuanto al tiempo de divergencia de las subespecies de *A. mellifera* (entre 0,7 y 1,3 millones de años atrás) y la separación entre *A. mellifera* y *A. cereana* (entre 6 y 8 millones de años atras) (Behura y col., 2006). Esta discrepancia ha sido la base de hipótesis alternativas acerca del origen de esta especie; Wilson propone el origen en África tropical o subtropical (Cánovas, De la Rúa, Serrano y Galián, 2008). Con el empleo de estudios morfométricos Ruttner en 1988 identificó cuatro linajes fundamentales de *A. mellifera*. El linaje M corresponde al oeste de Europa y al noroeste del Mediterráneo y comprende las subespecies *mellifera* e *iberiensis*, aunque originalmente incluía *intermissa*, *sahariensis*, *siciliana* y *ruttneri*. El linaje C que ocupa el sureste de Europa y el este del Mediterráneo (*ligústica*, *cárnica*, *macedónica*, *cecropia*, *cypria*, *adamí*). El linaje O en el oriente cercano y Asia occidental (*caucásica*, *anatoliaca*, *syriaca*, *meda*, *armeniaca*, *jemenitica* y *pomonella*) y el linaje A en África y algunas islas del oeste del Mediterraneo (*lamarckii*, *andansonii*, *scutellata*, *monticola*, *litorea*, *capensis*, *unicolor*).

MÉTODOS DE CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA

Morfometría geométrica

Tradicionalmente la taxonomía intraespecífica de la abeja se ha basado en la morfología. Hay que señalar, que no existe una característica morfológica clave para cada una de las especies de *A. mellifera*, sino que en cambio los diferentes caracteres morfométricos muestran una variación gradual y sus rangos se encuentra superpuestos entre las diferentes subespecies. Los principales caracteres empleados pueden ser subdivididos en cuatro grupos principales: tamaño corporal, patrones de coloración, vascularización de las alas y características de las pilosidades (M. D. Meixner y col., 2013). Si bien esta técnica constituye una poderosa herramienta para discriminar entre poblaciones, no es útil para establecer relaciones filogenéticas entre ellas (J-M Cornuet, Fresnaye y Tassencourt, 1975; Tomassone y Fresnaye, 1971). Además en el caso de las poblaciones americanas resulta aún menos adecuada, debido a que estas se presentan como una mezcla de las subespecies introducidas (M. D. Meixner y col., 2013).

Empleo de marcadores moleculares

Teniendo en cuenta las desventajas de los datos de origen morfométrico, los estudios de genética poblacional empleando marcadores moleculares han ido ganando terreno. Tal es el caso del polimorfismo de isoenzimas, a través de los cuales ha sido posible la construcción de árboles filogenéticos para diversas subespecies (G Badino, Celebrano y Manino, 1988; W. Sheppard y col., 1988) de *A. mellifera*. Aunque los niveles de variación genética detectados para las isoenzimas son pequeños, en combinación con datos morfométricos son adecuados para construir filogenias consistente (Arias y Sheppard 1996). Aun así, los datos aportados por estos marcadores han permitido un mejor entendimiento del flujo de genes, la estructura poblacional y la hibridación (Guido Badino, Celebrano y Manino, 1983; G Badino y col., 1988; Del Lama, Lobo, Soares y Del Lama, 1990; M. Meixner, Sheppard, Dietz y Krell, 1994; W. S. Sheppard y McPheron, 1986) y los efectos fundadores (J. Cornuet y Fresnaye, 1979; W. Sheppard y col., 1988). Uno de los loci enzimático más polimórficos y más ampliamente utilizados ha sido el locus *Mdh1* (malato deshidrogenasa) (J. Cornuet, 1982; J. Cornuet, Daoudi y Chevalet, 1986; Del Lama y col., 1990; Lobo, Del Lama y Mestriner, 1989). Sin embargo existe evidencia de que la variación de este locus puede ser interpretado como una consecuencia de la adaptación fisiológica a diferentes climas y no tiene porque necesariamente reflejar flujos genéticos (Coelho y Mitton, 1988; Nielsen, Page Jr y Crosland, 1994).

Empleo del ADN mitocondrial

Por su parte, el ADN mitocondrial (ADNmt) ha demostrado ser una valiosa alternativa para estudios filogeográficos a nivel de especie o subespecie (Avisé y cols., 1987). La herencia materna exclusiva por parte del ADNmt lo hace muy adecuado en estudios poblacionales de la abeja melífera, por dos razones fundamentales. En primer lugar todos los individuos de la colonia son descendencia de la misma reina y el ADNmt es idéntico entre todos los individuos de la colmena; esta característica es incluso válida durante el proceso de enjambrazón porque la reina que abandona la colmena original es reemplazada por una de sus hijas. En segundo lugar los procesos de colonización son llevados a cabo por la colmena y no por los machos de la especie.

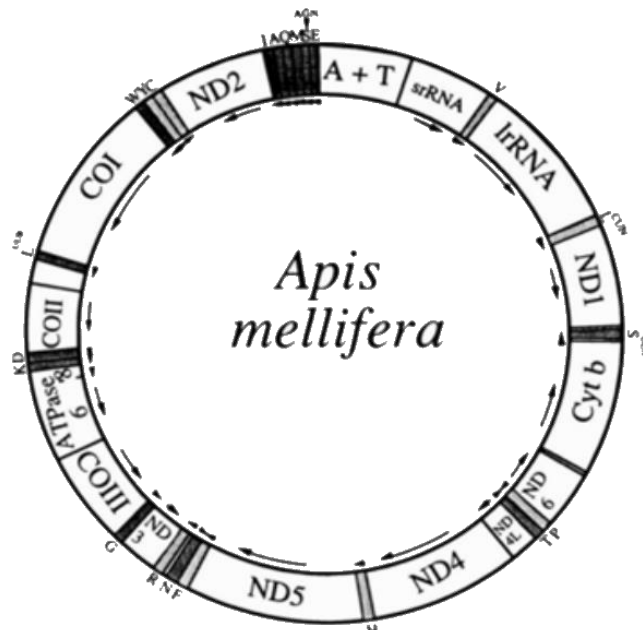


Figura 1. ADN mitocondrial de *A. mellifera*. Los genes que corresponden a RNA de transferencia están denotados por el código de una letra de acuerdo al aminoácido correspondiente. Las regiones que codifican para proteínas están identificadas como CO, COII y COIII, aquellas que corresponden a las diferentes subunidades de la citocromo oxidasa c; Cyt b para la citocromo b y ND1-6 y ND4L para las subunidades del sistema NADH deshidrogenasa. La región A-T corresponde a una región rica en Adenina y Timina que se cree contiene el origen de replicación. Las flechas representan la dirección de la migración en cada una de las regiones codificantes. Adaptado de Crozier 1993 (Crozier y Crozier, 1993).

El ADNmt de *A. mellifera* (Figura 1) es una molécula circular de entre 16500 y 17000 pb de longitud y que excepto por algunos de los genes que codifican para moléculas de ARN de transferencia (tRNA) es muy similar al de *Drosophila* (Jean-Marie Cornuet, Garnery y Solignac, 1991; Crozier, Crozier y Mackinlay, 1989). Está compuesto por 13 genes codificantes de proteínas que incluyen las diferentes subunidades de la citocromo oxidasa c y de la NADH deshidrogenasa, 22 genes que codifican para RNA de transferencia y dos de ARN ribosomal.

Históricamente se han empleado diferentes regiones del ADN mitocondrial de *Apis mellifera* para el estudio filogenético de esta especie. En 1995 Arias y Sheppard emplearon una región que comprendía parte de la subunidad 2 de la NADH deshidrogenasa y de los genes de ARNt de la isoleucina (Arias y Sheppard, 1996). Con el empleo de este marcador fue posible la identificación de

cuatro linajes correspondientes a los descritos morfológicamente (Arias y Sheppard, 1996; Ruttner, 1988).

En 1992 Garnery y colaboradores identificaron dos regiones que presentaban polimorfismos de longitud en el ADNmt de abejas europeas (L. Garnery, Cornuet y Solignac, 1992). De ambas secuencias la más utilizada actualmente es la comprendida entre los genes que codifican el ARN de transferencia de la leucina (ARN^{tleu}) y la subunidad 2 de la citocromo oxidasa (COII). Esta región intergénica está compuesta por dos tipos de secuencias: P y Q. La secuencia P puede estar ausente P0 (linaje C del este de Europa), o estar presente en cuatro variantes P (linaje M Europa occidental), P1 (sublinaje A de la costa atlántica africana) (Evans y col., 2013; L. Garnery y col., 1992) y P2 linaje Y de Etiopia (De la Rúa, Jaffé, Dall'Olio, Muñoz y Serrano, 2009). El número de secuencias Q de conjunto con la presencia de secuencias P, permite identificar los diferentes linajes mitocondriales (Figura 2).

Hay que señalar que los tres linajes fundamentales identificados por ADNmt (A,C y M)(L. Garnery y col., 1992) solo coinciden en parte con los propuestos por Ruttner (A,C,M y O) basados en datos morfométricos (Ruttner, 1988) través de los análisis de ADNmt no resulta posible diferenciar entre las poblaciones correspondientes al este de Europa y del Mediterráneo, y al Medio Oriente y Asia occidental que pertenecen a los linajes C y O según el sistema de Ruttner, pues entre estos grupos no existía una variación significativa desde el punto de vista del ADNmt (L. Garnery y col., 1992).Teniendo esto en cuenta, se propuso la existencia de un linaje C mitocondrial que incluía a los linajes C y O definidos morfométricamente (L Garnery y col., 1992; L. Garnery, Solignac, Celebrano y Cornuet, 1993). Sin embargo a principios de este siglo se identificaron poblaciones de Asia Occidental y el Nordeste africano que exhibían patrones mitocondriales diferentes a los propuestos por Garnery en 1992 lo cual condujo a la postulación de un cuarto linaje mitocondrial que fue nombrado O (Franck, Garnery, Celebrano, Solignac y Cornuet, 2000; Palmer y Oldroyd, 2000).

Posteriores investigaciones permitieron identificar a este linaje O como un sublinaje del linaje africano A con lo cual su nombre fue cambiado a Z (Alburaki et al., 2011).

Un método complementario comúnmente empleado para los estudios de ADN mitocondrial en abejas ha sido el análisis de polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción (RFLP del inglés Restriction Fragment Length Polymorphisms). El polimorfismo en este tipo de estudios se observa como resultado de los patrones de bandas electroforéticas que se obtienen al digerir el ADNm con endonucleasas de restricción tales como *AccI*, *AvaI*, *BclI*, *BglII*, *EcoRI*, *HincII*, *HindII*, *HindIII*, *NdeI*,

PstI, PvuII, Xba. Este ensayo tiene un alto poder de discriminación y la mayor parte de los resultados, respaldan tres (A, M, C) de los cuatro linajes propuestos por Ruttner (Ruttner, 1988), además de que permiten identificar haplotipos que en cierta medida pueden ser asociados con subespecies particulares.

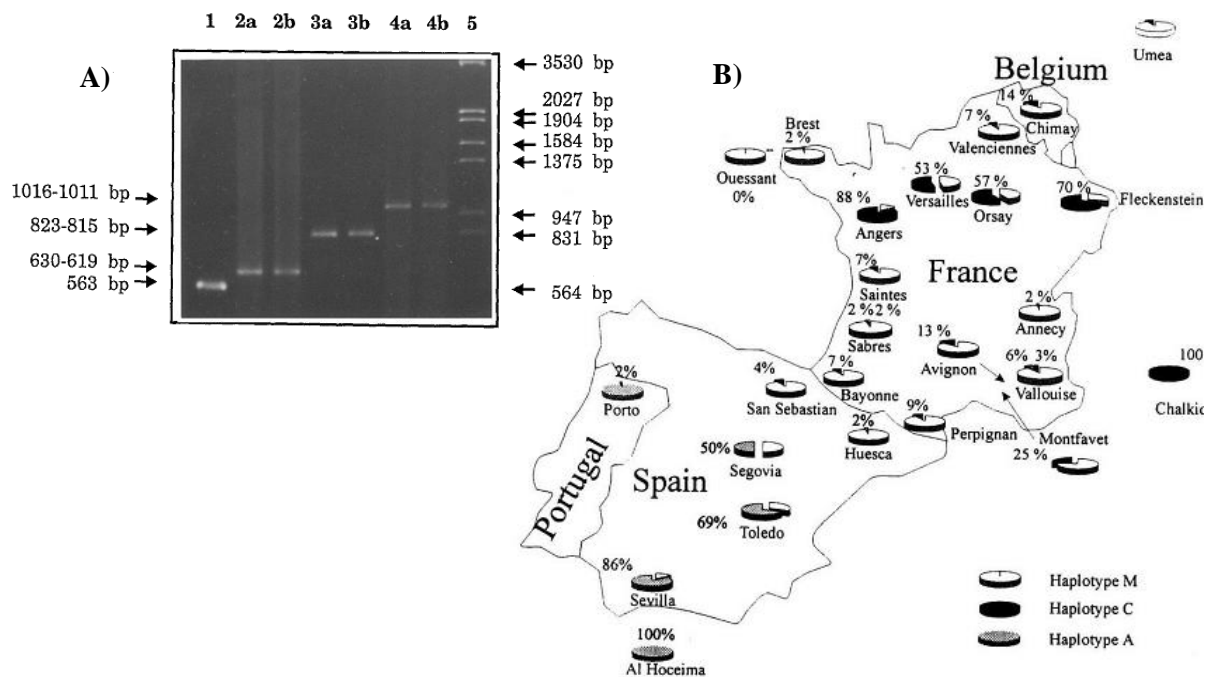


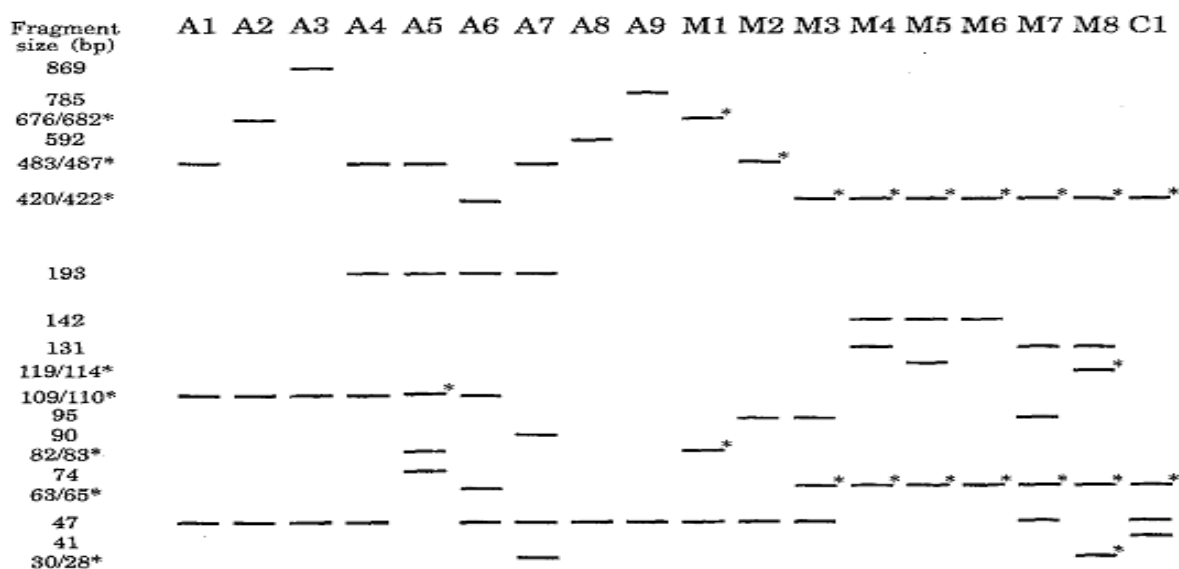
Figura 2: Linajes mitocondriales en *A. mellifera*. A) Electroforesis en gel de agarosa de amplicones de la región COII-tRNA^{Leu}. Carriles (1) Q, (2a) PQ, (2b) P₀Q, carril (3a) PQQ, (3b) P₀QQ, (4a) PQQQ, (4b) P₀QQQ, (5) patrón de peso molecular. Tomado de Garnery 1993 (L. Garnery y col., 1993).

B) Distribución de linajes mitocondriales en países de Europa occidental

Sin embargo, hasta la actualidad no ha sido posible identificar una endonucleasa o una combinación de ellas que generen patrones de bandas que puedan ser marcadores diagnóstico para la identificación de subespecies (M. D. Meixner y col., 2013). Esta técnica ha sido empleada para la identificación de subespecies del Nuevo Mundo que experimentan procesos de africanización (Clarke, Rinderer, Franck, Quezada-Euan y Oldroyd, 2002; Gleen Hall y Smith, 1991; Pinto y col., 2003). La amplificación de los genes COI y ND5 seguido de la digestión con NcoI/StyI y AluI produce patrones característicos de *A.m. macedónica* (Bouga, Harizanis, Kilias y Alahiotis, 2005; Stevanovic, Stanimirovic, Radukovic y Kovacevic, 2010). La discriminación entre abejas de Grecia y Bulgaria

puede llevarse a cabo con la digestión de COI con Sspl y de ND5 con HindI y FokI (Ivanova y Bouga, 2009). La amplificación de la región COII-tRNA^{Leu} por PCR y su posterior digestión con la enzima de restricción Dral, conocido en su conjunto como **prueba Dral** ha sido empleada tanto en poblaciones europeas como americanas para la determinación de los linajes y haplotipos mitocondriales (L. Garnery y col., 1993; Rortais, Gérard, Alburaki, Legout y Garnery, 2011). Este tipo de ensayo brinda información acerca de los haplotipos dentro de los linajes (L. Garnery y col., 1993) y a pesar de sus limitaciones es el método estándar para la identificación matrilineal de las abejas, debido a que ha probado ser la herramienta más poderosa e informativa entre las basadas en PCR.

Por otra parte los resultados de esta técnica están ampliamente documentados ya sea en poblaciones silvestres como en apiarios. Otra de sus ventajas es que puede ser llevado a cabo en un laboratorio equipado de manera básica y toma alrededor de dos días obtener resultados (M. D. Meixner y col., 2013). De manera general este tipo de ensayo tiene un alto poder de resolución que resulta de la combinación de polimorfismo de longitud con polimorfismo de sitios de restricción y ha permitido la identificación de centenares de haplotipos que han sido asignados a los linajes evolutivos. Aun así es incapaz de identificar abejas al nivel de subespecies porque no produce haplotipos diagnóstico (esto significa que más de una especie comparte el mismo haplotipo), no obstante, es posible encontrar cierta relación entre algunos haplotipos y subespecies (Franck y col., 2001; Muñoz, Dall'Olio, Lodesani y De la Rúa, 2009; Wilson, 1971). Con el empleo de este procedimiento, ha sido posible identificar cerca de 91 haplotipos pertenecientes al linaje M (Rortais y col., 2011), una veintena de variantes del linaje A, cinco para el O y dos para el linaje Y (Franck y col., 2001).



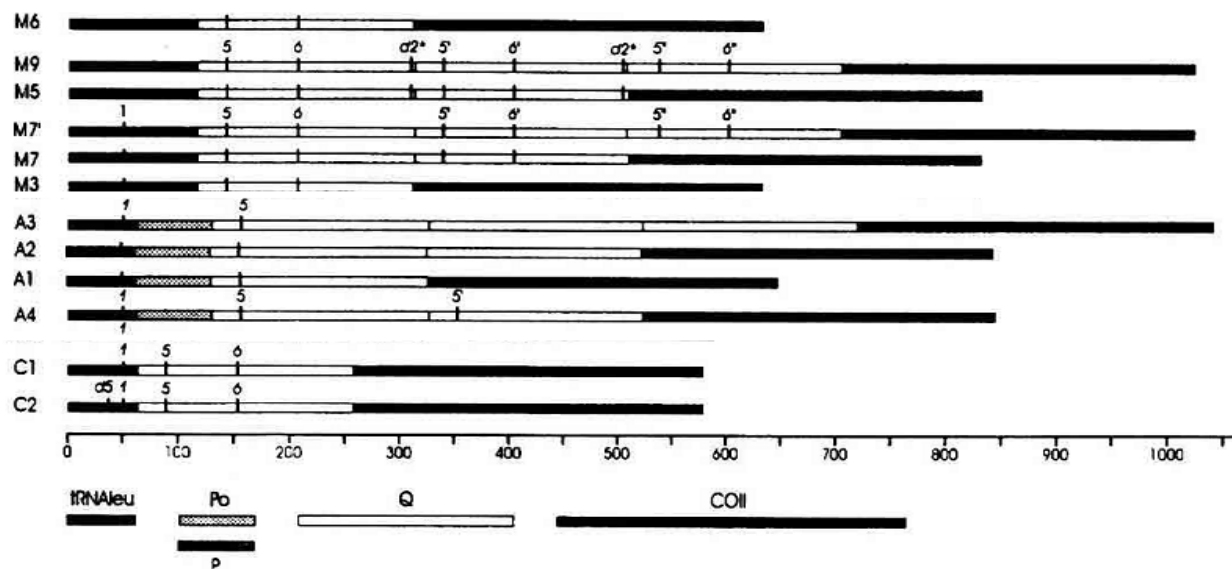


Figura 3. Descripción de haplotipos mitocondriales con el test Dral.

- A) Esquema de una electroforesis en gel de agarosa de los patrones de bandas generados por la enzima de restricción Dral. Los patrones de A1-9 pertenecen al linaje A, del M1-8 al linaje de Europa occidental y el C al patrón del norte del mediterraneo. Los fragmentos de talla molecular similar fueron alineados, e identificados con o asterico(*). Tomado de Garnery 1993. (L. Garnery y col., 1993).**
- B) Mapa físico de la región COI-COII de algunos haplotipos de los linajes A, M y C deducidos por digestión con Dral, las pequeñas inserciones y las pequeñas deletiones, están denotadas por "i" y "d" respectivamente. Los haplotipos que aparentemente poseen el mismo patrón de restricción, pero que en realidad tienen varias repeticiones de la secuencias Q están marcadas con * después de la identificación del haplotipo. Adaptado de Garnery 1998. (Lionel Garnery y col., 1998).**

CONCLUSIONES

A pesar de sus limitaciones como la imposibilidad de obtener haplotipos específicos para las diferentes subespecies, si es posible encontrar cierto grado de correlación entre haplotipos y subespecies. La principal ventaja de este método radica en la sencillez y la velocidad con que se obtienen los resultados y la relativa simpleza de su análisis. Además resulta un análisis relativamente barato en comparación con estudios de microsatélites y polimorfismo de nucleótidos simples. Por otra parte en el caso de las abejas resulta con ventajas adicionales debido a la exclusiva herencia matrilineal del ADNmt, pues en una colmena todos los individuos son hijos de la misma madre, lo cual reduce el tamaño muestral a un solo individuo por colmena.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Arias, M. y Sheppard, W. (1996). Molecular Phylogenetics of Honey Bee Subspecies (*Apis mellifera* L.) Inferred from Mitochondrial DNA Sequence. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 5(3), 557-566.
- Badino, G., Celebrano, G. y Manino, A. (1983). *Population structure and Mdh-1 locus variation in Apis mellifera ligustica*. *Journal of Heredity*, 74(6), 443-446.
- Badino, G., Celebrano, G. y Manino, A. (1988). *Genetica di popolazione delle sottospecie mediterranee di Apis mellifera L. sulla base di varianti alloenzimatiche*. *Apic. Mod*, 79, 233-239.
- Behura, S. K., Johnston, S., Smith, D. R., Tsutsui, N. D., Whitfield, C. W., Berlocher, S. H., Clark, A. G., Sheppard, W. S., Suarez, A. V. y Weave, D. (2006). Thrice Out of Africa: Ancient and Recent Expansions of the Honey Bee, *Apis mellifera*. *Science*, 314(October 2015).
- Bouga, M., Harizanis, P. C., Kiliyas, G. y Alahiotis, S. (2005). *Genetic divergence and phylogenetic relationships of honey bee Apis mellifera (Hymenoptera: Apidae) populations from Greece and Cyprus using PCR - RFLP analysis of three mtDNA segments*. *Apidologie*, 36.
- Cánovas, F., De la Rúa, P., Serrano, J. y Galián, J. (2008). *Geographical patterns of mitochondrial DNA variation in Apis mellifera iberiensis (Hymenoptera: Apidae)*. *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research*, 46(1), 24-30.
- Clarke, K. E., Rinderer, T., Franck, P., Quezada-Euan, J. G. y Oldroyd, B. P. (2002). *The Africanization Of Honeybees (Apis Mellifera L.) Of The Yucatan: A Study Of A Massive Hybridization Event Across Time*. *Evolution*, 56.
- Coelho, I. y Mitton, I. (1988). *Oxygen consumption during hovering is associated with genetic variation of enzymes in*. *Ecology*, 2, 1-41.
- Cornuet, J.-M., Fresnaye, J. y Tassencourt, L. (1975). *Discrimination Et Classification De Populations D'abeilles A Partir De Caractères Biométriques**. *Apidologie*, 6(2), 145-187.
- Cornuet, J.-M., Garnery, L. y Solignac, M. (1991). *Putative origin and function of the intergenic region between COI and COII of Apis mellifera L. mitochondrial DNA*. *Genetics*, 128(2), 393-403.
- Cornuet, J. (1982). *The MDH polymorphism in some West Mediterranean honeybee populations. Paper presented at the Proceedings of the IX Congress IUSSI, Westview Press, Boulder, CO*.
- Cornuet, J., Daoudi, A. y Chevalet, C. (1986). *Genetic pollution and number of matings in a black honey bee (Apis mellifera mellifera) population*. *Theoretical and applied genetics*, 73(2), 223-227.
- Cornuet, J. y Fresnaye, J. (1979). *Honey yield in interracial honeybee (Apis mellifica L.) hybrids during successive generations of backcrosses to the local race*. *Apidologie (France)*.
- Crozier, R. y Crozier, Y. (1993). *The mitochondrial genome of the honeybee Apis mellifera: complete sequence and genome organization*. *Genetics*, 133(1), 97-117.

- Crozier, R., Crozier, Y. y Mackinlay, A. (1989). *The CO-I and CO-II region of honeybee mitochondrial DNA: evidence for variation in insect mitochondrial evolutionary rates. Molecular biology and evolution*, 6(4), 399-411.
- De la Rúa, P., Jaffé, R., Dall'Olio, R., Muñoz, I. y Serrano, J. (2009). *Biodiversity, conservation and current threats to European honeybees. Apidologie*, 40(3), 263-284.
- Del Lama, M., Lobo, J., Soares, A. y Del Lama, S. (1990). *Analysis of Africanized honeybee populations.*
- Evans, J. D., S, S. R., Chen, Y. P., Budges, G., Cornman, R. S., Rua, P. D. L., Miranda, J. R. D., Foret, S., Foster, L., Gauthier, L., Genersch, E., Gisder, S., Jarosch, A., Kucharski, R., Lopez, D., Lu, C. M., Muñoz, I. y Pinto, M. A. (2013). *Standard methods for molecular research in Apis mellifera. Journal of Apicultural Research*, 1(4), 1-54.
- Franck, P., Garnery, L., Celebrano, G., Solignac, M. y Cornuet, J. M. (2000). *Hybrid origins of honeybees from Italy (Apis mellifera ligustica) and Sicily (A. m. sicula). Molecular Ecology*, 9(7), 907-921.
- Franck, P., Garnery, L., Loiseau, A., Oldroyd, B. P., Hepburn, H. R., Solignac, M. y Cornuet, J.-M. (2001). *Genetic diversity of the honeybee in Africa: microsatellite and mitochondrial data. Heredity*, 86.
- Garnery, L., Cornuet, J.-M. y Solignac, M. (1992). *Evolutionary history of the honey bee Apis mellifera inferred from mitochondrial DNA analysis. Molecular Ecology*, 1, 1454-1154.
- Garnery, L., Franck, P., Baudry, E., Vautrin, D., Cornuet, J.-M. y Solignac, M. (1998). *Genetic diversity of the west European honey bee (Apis mellifera mellifera and A. m. iberica). 1. Mitochondrial DNA. Genet. Sel. Evo.*, 30.
- Garnery, L., Solignac, M., Celebrano, G. y Cornuet, J. M. (1993). *A simple test using restricted PCR-amplified mitochondrial DNA to study the genetic structure of Apis mellifera L. . Experientia*, 49.
- Gleen Hall, H. y Smith, D. R. (1991). *Distinguishing African and European honeybee matrilineages using amplified mitochondrial DNA. Proceedings of the National Academy of Sciences*, 88.
- Ivanova, E. y Bouga, M. (2009). *Genetic variability in honey bee population from Northern Bulgaria. Paper presented at the Proceedings of the 41st Congress Apimondia.*
- Lobo, J. A., Del Lama, M. y Mestriner, M. (1989). *Population differentiation and racial admixture in the Africanized honeybee (Apis mellifera L.). Evolution*, 794-802.
- Meixner, M., Sheppard, W., Dietz, A. y Krell, R. (1994). *Morphological and allozyme variability in honey bees from Kenya. Apidologie*, 25(2), 188-202.
- Meixner, M. D., Pinto, M. A., Bouga, M., Kryger, P., Ivanova, E. y Fuchs, S. (2013). *Standard methods for characterising subspecies and ecotypes of Apis mellifera. Journal of Apicultural Research*, 52(4).

- Muñoz, I., Dall'Olio, R., Lodesani, M. y De la Rúa, P. (2009). *Population genetic structure of coastal Croatian honeybees (Apis mellifera carnica)*. *Apidologie*, 40 (6), 617-626.
- Nielsen, D., Page Jr, R. y Crosland, M. (1994). *Clinal variation and selection of MDH allozymes in honey bee populations*. *Experientia*, 50(9), 867-871.
- Palmer, K. A. y Oldroyd, B. P. (2000). *Evolution of multiple mating in the genus Apis*. *Apidologie* 31 (2000) 235–248, 31, 235-248.
- Pinto, M. A., Johnston, S., Rubink, W., Coulson, R. N., Patton, J. C. y Sheppard, W. S. (2003). *Identification of Africanized Honey Bee (Hymenoptera: Apidae) Mitochondrial DNA: Validation of a Rapid Polymerase Chain Reaction-Based Assay*. *Annal of Entomological Society of America*, 96(5), 679-684.
- Rortais, A., Gérard, A., Alburaki, M., Legout, H. y Garnery, L. (2011). *Review of the Dral COI-COII test for the conservation of the black honeybee (Apis mellifera mellifera)*. *Conservation Genet Resour*, 3, 383-391.
- Ruttner, F. (1988). *Biogeography and taxonomy of Honeybees*.
- Sheppard, W., Huettel, M., Needham, G., Page Jr, R., Delfinado-Baker, M. y Bowman, C. (1988). *Biochemical genetic markers, intraspecific variation, and population genetics of the honey bee, Apis mellifera. Africanized honey bees and bee mites.*, 281-286.
- Sheppard, W. S. y McPheron, B. A. (1986). *Genetic variation in honey bees from an area of racial hybridization in western Czechoslovakia*. *Apidologie*, 17(1), 21-32.
- Sheppard, W. S. y Meixner, M. D. (2003). *Apis mellifera pomonella*, a new honey bee subspecies from Central Asia. *Apidologie*, 34(4), 367-376.
- Stevanovic, J., Stanimirovic, M., Radukovic, M. y Kovacevic, S. R. (2010). *Biogeographic Study of the Honey Bee (Apis mellifera L.) from Serbia, Bosnia and Herzegovina and Republic of Macedonia Based on Mitochondrial DNA Analyses*. *Russian Journal of genetics*, 46.
- Tomassone, R. y Fresnaye, J. (1971). *Étude d'une méthode biométrique et statistique permettant la discrimination et la classification de populations d'abeilles (Apis mellifica L.)*. *Apidologie*, 2(1), 49-65.
- Wilson, E. O. (1971). *The insect societies*. *The insect societies*.